

Zwischenbericht zum Forschungsprojekt Sebadenitis (SA)



Ina Pfeiffer and Tina Roth
Institute of Veterinary Medicine
University of Göttingen

Forschungsarbeiten für einen genetischen Nachweis

Zwischenbericht

1. Einführung

- 1.1. Überblick zu Sebadenitis
- 1.2. Eine neue Perspektive: RNA-Screen
- 1.3. MHC-Kandidaten Gene

2. MHC-Kandidaten Gen Analyse

- 2.1. Einführung
- 2.2. Material und Methoden
- 2.3. Resultate

3. Diskussion

- 3.1. MHC ein Schlüssel zu SA?
- 3.2. Zukünftige Experimente

Einführung

1.1. Überblick zu SA



Photograph: Joop & Astrid Ouwerkerk

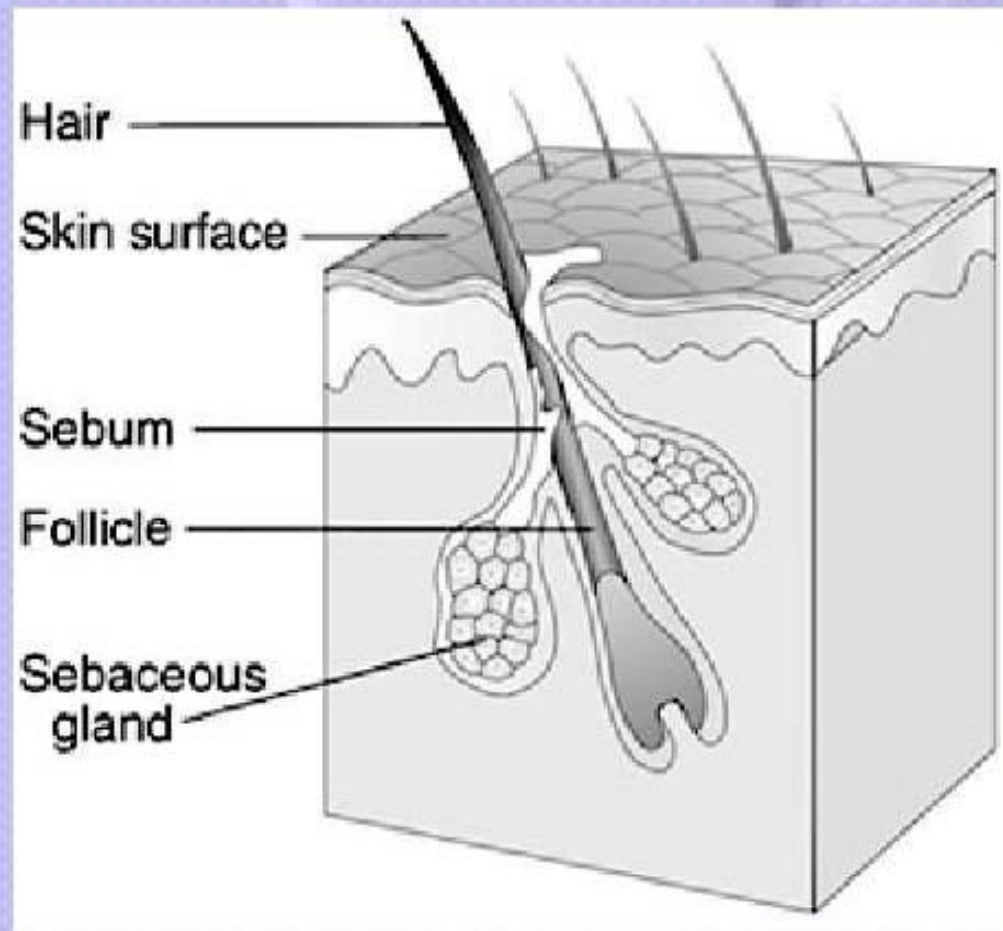


Photograph: H. Mewes



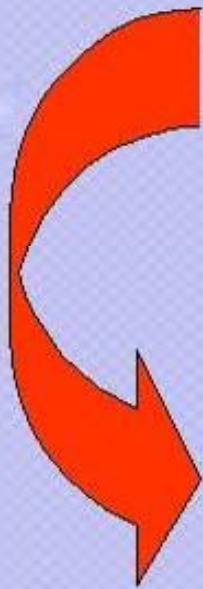
1.1. Überblick zu SA

Anatomie der Talgdrüse



1.1. Überblick zu SA

Beprobung



Blut



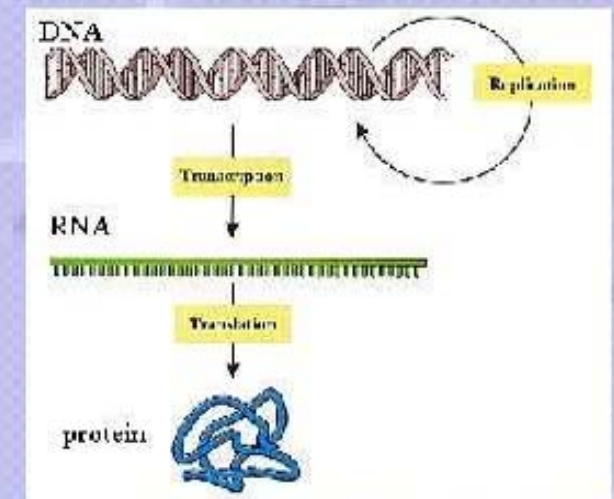
Biopsie



Probenzusammenstellung seit 2003

1.2. Eine neue Perspektive: RNA-Screen

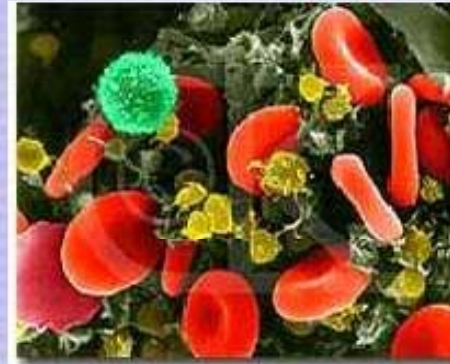
RNA-Screen: Die Differential Display Technology (DDT)



Visualisation der differential exprimierten RNAs über DDT-Technologie

1.2. Eine neue Perspektive: RNA-Screen

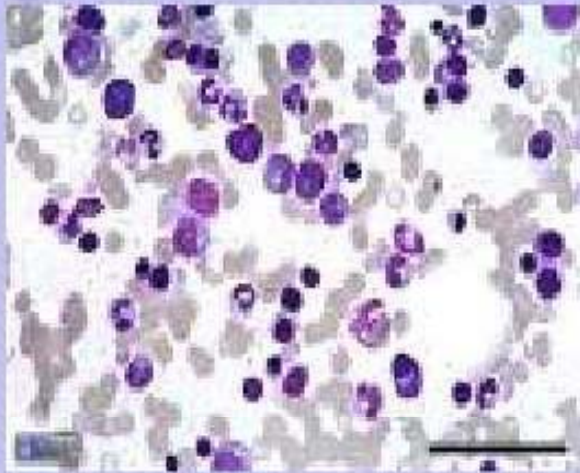
Die Resultate der Differential Display Technologie (DDT)



Es konnte über die DDT-Technologie gezeigt werden:
Eine spezielle RNA kommt nur in dem Blut von
SA-erkrankten und nicht in gesunden Akitas vor.

1.2. Eine neue Perspektive: RNA-Screen

Ein Strategieplan um die verantwortlichen Gene zu finden:



1. Schlüsselinformation:

- Eine spezielle RNA ist nur im Blut von +SA Akitas vorhanden



2. Schlüsselinformation:

Blut übernimmt 2 Hauptaufgaben:

A) Transportfunktion durch den Körper

B) Schutzfunktion für den Körper gegenüber Infektionen oder "körperfremden" Zellen

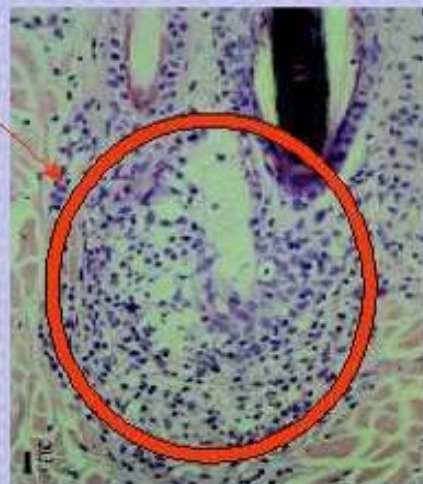
1.2. Eine neue Perspektive: RNA-Screen

Ein Strategieplan um die verantwortlichen Gene zu finden:



Situation in gesunden Akittas:

- Sebozyten in der Talgdrüse



Situation in SA-erkrankten Akittas:

- Massive Infiltration von Antigen-präsentierenden Zellen in die Talgdrüsen
- Makrophagen
- T-Lymphozyten
- Dendritische Zellen

1.3. MHC-Kandidaten Gene

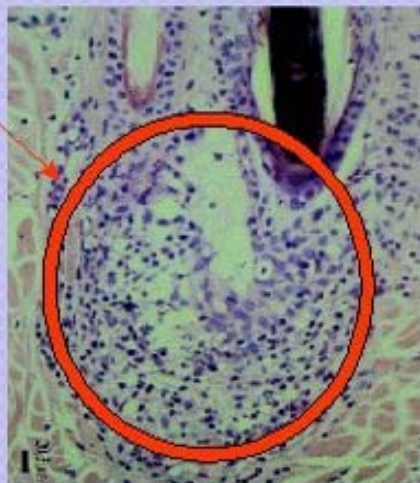
Ein Strategieplan um die verantwortlichen Gene zu finden:



Was verursacht den Entzündungsprozess in der Talgdrüse?

A) SA ist ursächlich keine Virusinfektion, keine bakterielle Infektion oder keine Pilzkrankung

B) Aus welchen Gründen sammeln sich typische Zellen aus dem Blut, wie T-Lymphozyten in den Talgdrüsen an?

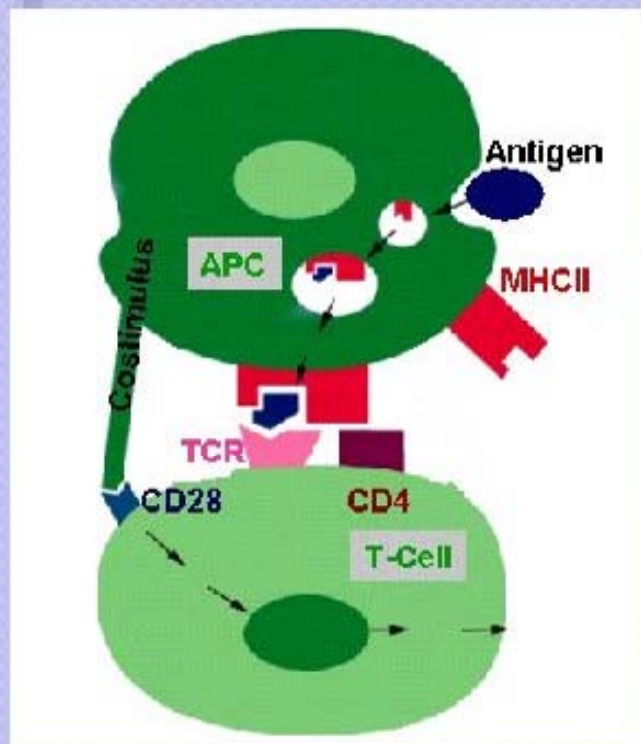


Normalerweise handelt es sich bei T-Lymphocyten um Komponenten deren Aufgabe darin besteht "eigen" von "nicht-eigen" zu unterscheiden.

Key role: "Major histocompatibility complex (MHC) proteins"

2. MHC-Kandidaten Gen Analyse

2.1. Einführung



Major histocompatibility complex (MHC)
(Haupthistokompatibilitätskomplex)

MHC Klasse I Proteine

MHC Klasse I Proteine kommen auf nahezu allen Körperzellen vor. Sie werden kontinuierlich von T-Lymphozyten kontrolliert und sobald die Erkennungsstruktur verändert ist, werden diese Zellen eliminiert.

MHC Klasse II Proteine

MHC Klasse II Proteine befinden sich auf der Oberfläche von sogenannten Antigen-präsentierenden Zellen, wie Makrophagen, Dendritische Zellen oder B-Zellen. Wenn diese Zellen einen Virus oder andere körperfremde Proteine aufgenommen haben, werden diese via MHC-präsentiert und anschließend von T-Lymphozyten erkannt und vernichtet.

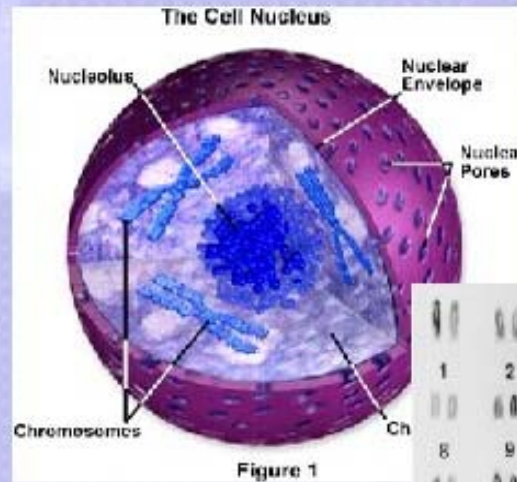
2.1. Einführung

Das Hundegenom wurde vom "Whitehead Institute Center for Genome Research (Cambridge, MA)" weitestgehend entschlüsselt und kann über genetische Datenbanken abgerufen werden.



Tasha der Boxer

2.8×10^9 bp
(2.8 billion basepairs)



Zelle



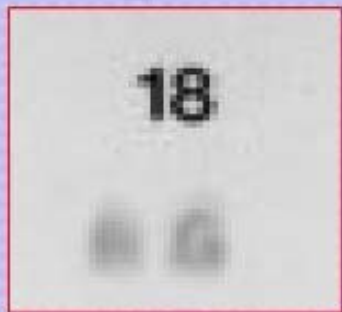
Chromosomen

DNA-
Basenpaare
A,C,G,T

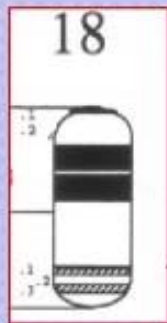


2.2. Material und Methoden

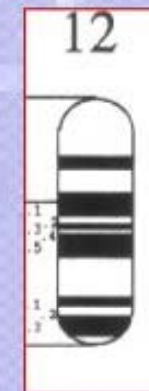
MHC Kandidaten Gene



58*10⁶ bp
(728 Gene)



MHC Class I Gene	Chromosom
DLA-88	12
DLA-79	18
DLA-12	12
DLA64	12



75*10⁶ bp
(570 Gene)

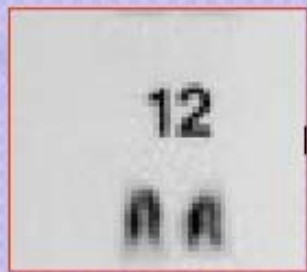


MHC Class II Gene	Chromosom
DLA-DRA1	12
DLA-DRB1	12
DLA-DQA1	12
DLA-DQB1	12

2.2. Material und Methoden

Vorgehensweise um ein Gen zu entschlüsseln

Chromosom 12



$75 \cdot 10^6$ bp
(570 Gene)



Beispiel: DLA-DRA1



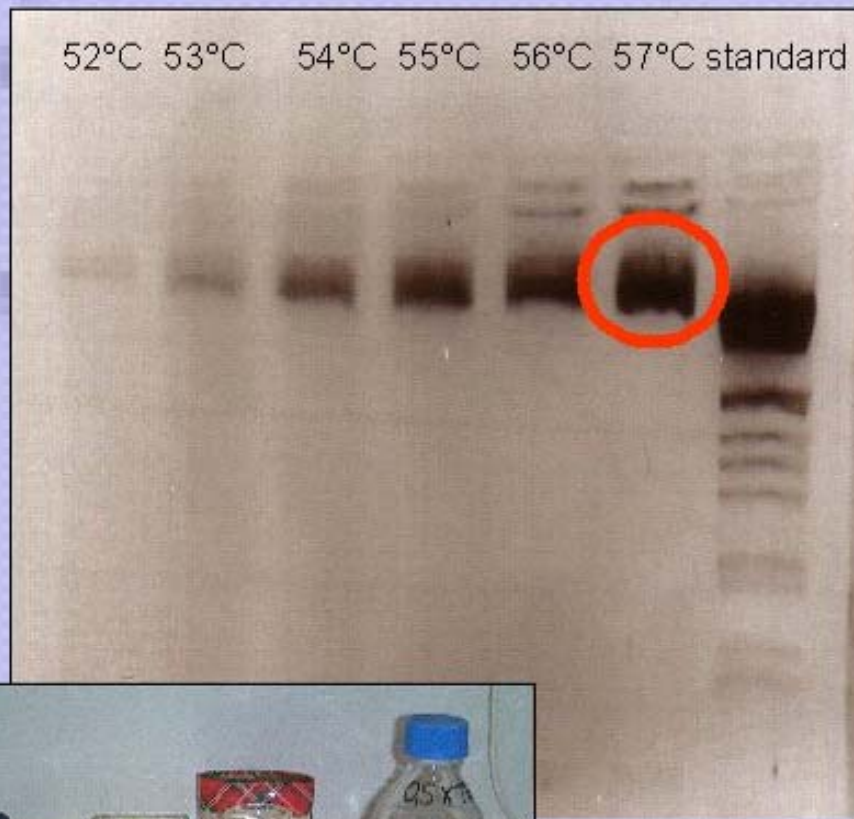
Primer forward

Primer reverse

2.2. Material und Methoden

Optimierung der Reaktionsbedingungen:

- Jedes Primerpaar muß ausgetestet und überprüft werden.
- Dabei werden nur Reaktionsprodukte ausgewählt, die eine einzige Bande hervorbringen.



2.2. Material und Methoden

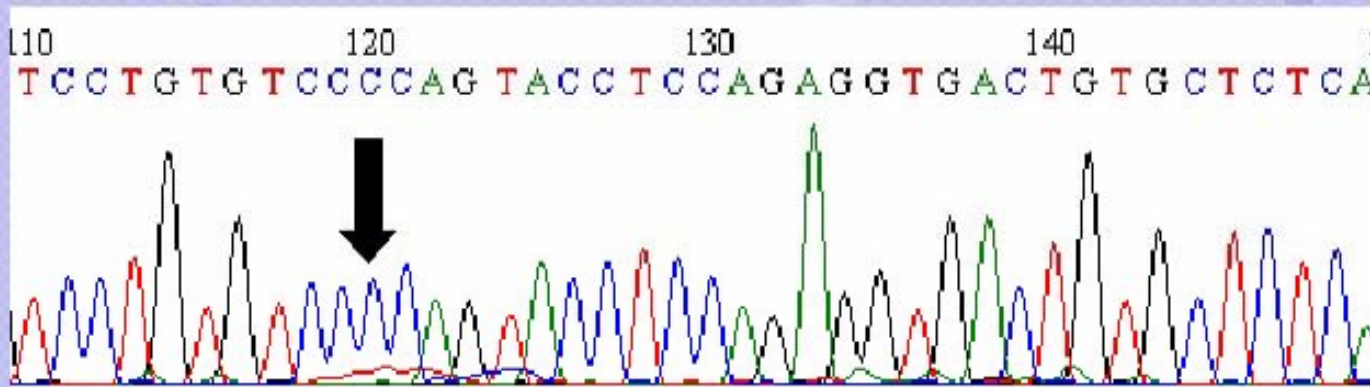
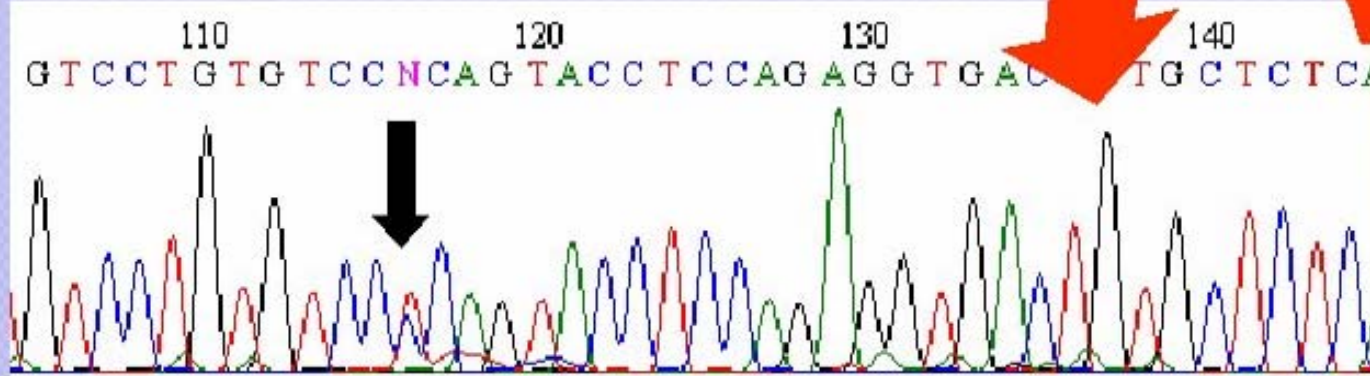
Die Sequenzierung



ABIprism 3100 genetic Analyzer

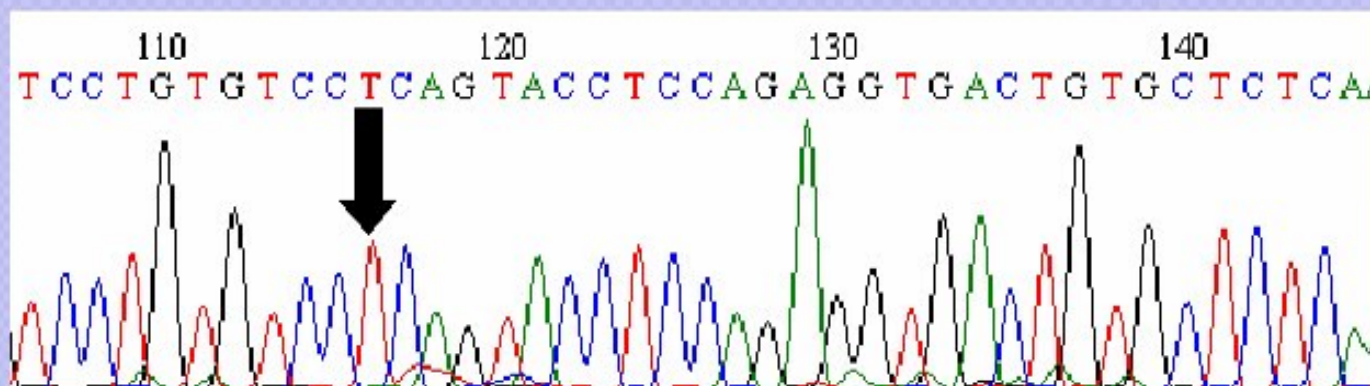
Heterozygot

C/T



Homozygot

C/C

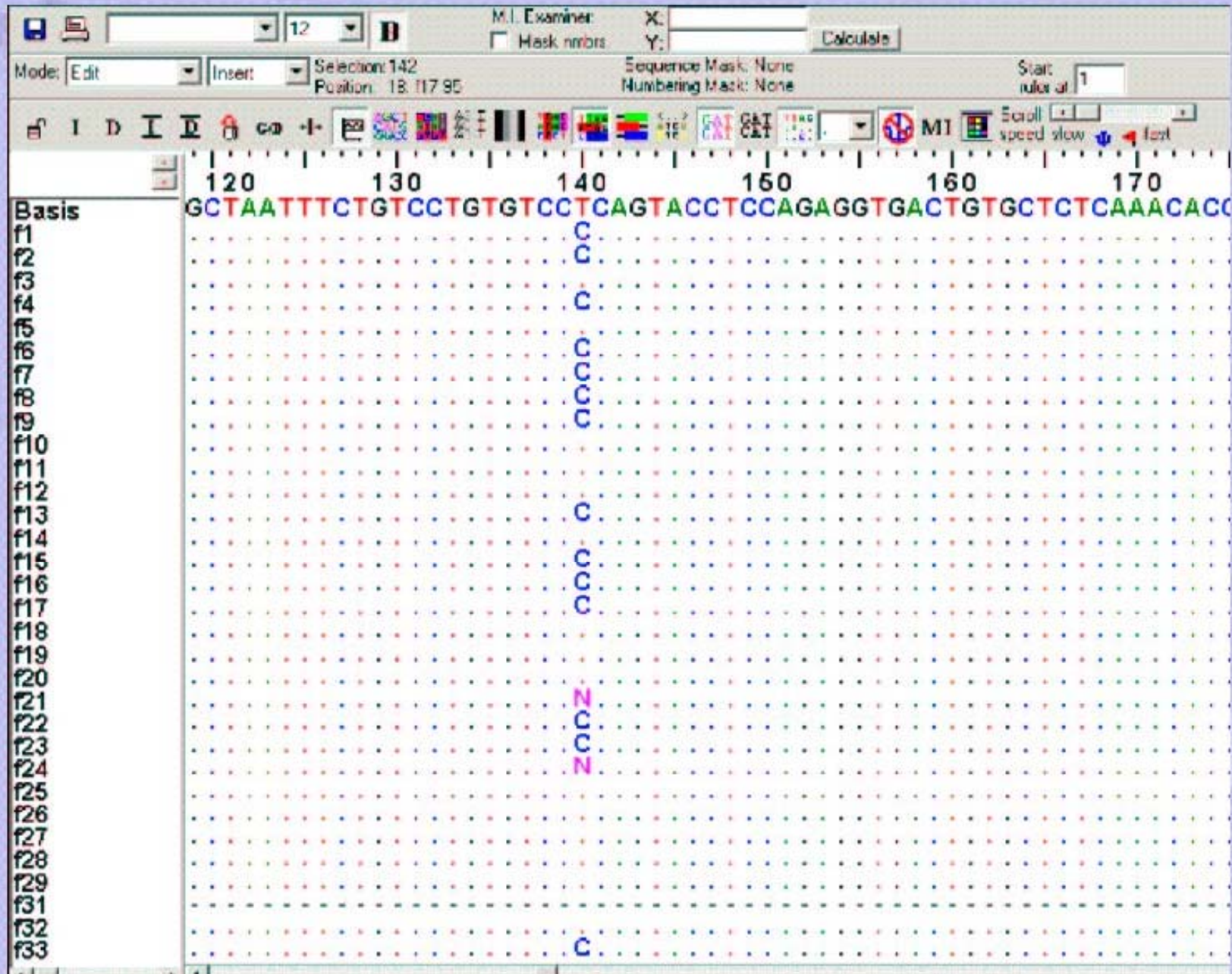


Homozygot

T/T

2.2. Material und Methoden

Sequenz-Alignment



2.3. Ergebnisse

MHC Klass I Gene	Status	Die PCR-Produkte	Neu- Entwicklung
DLA 88	incomplete	1	
DLA 79	complete	7	new
DLA 12	complete (ex.3)	6	new
DLA 64	incomplete	4	new

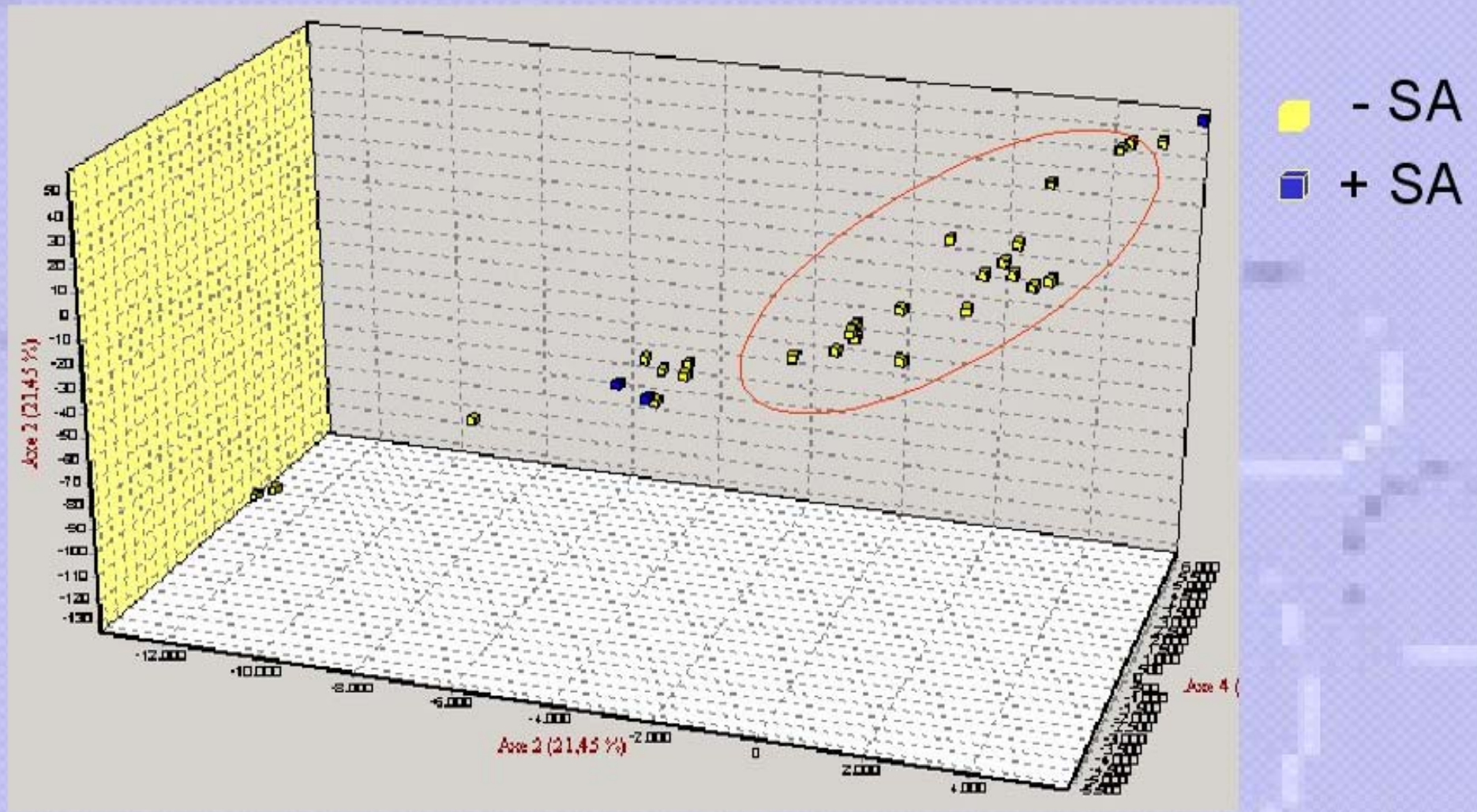
MHC Klass II Gene	Status	Die PCR-Produkte	Neu- Entwicklung
DLA-DRA1	complete	4	new
DLA-DRB1	complete	1	
DLA-DQA1	complete	1	
DLA-DQB1	complete	1	

2.3. Ergebnisse

Gene	N	Total				SA+			
		A	T	G	C	A	T	G	C
DLA79D P1	31			13	49			1	5
DLA79F P1	31	4			58				6
DLA12A P1	21		35		7		6		
DLA12A P2	22	36		8		6			
DLA12E P1	30		54		6		6		
DLA12E P2	30	15		45				6	
DLA12E P6	30		53	7			5	1	
DLA12E P9	30		52	8			6		
DLA12E P10	30		17	43			1	5	
DLA12E P13	30			13	47			1	5
DLA12E P14	30			54	6			6	
DRB P1	31	13		49		1		5	
DQA P1	32		15		49		1		5
DQA P2	32	51			13	5			1
DQB P2	32		25		39		1		5

2.3. Ergebnisse

Berechnung der genetischen Distanzen



3. Diskussion

3.1. MHC ein Schlüssel für SA?

Zusammenfassung:

- Die Testergebnisse weisen auf eine reduzierte genetische Variabilität in den untersuchten MHC - loci bei SA-erkrankten Akitas hin.
- Zur weiteren Überprüfung müssen demnächst weitere SA-erkrankte Akitas untersucht werden, um die Ergebnisse statistisch abzusichern.
- Mit diesem experimentellen Ansatz lassen sich möglicherweise sogenannte SA-Risikogruppen feststellen
- Die neu entwickelten Untersuchungsmethoden ermöglichen auch bei anderen Erkrankungen mit autoimmunem Hintergrund eine schnelle Überprüfung: u.a. VKH

3.2. Weiterführende Experimente

- PCR Optimierung für die Gene DLA 88 und DLA 64
- Aufbau einer Datenbank zu genetischen Besonderheiten bei MHC Kandidaten Genen
- Zukünftige Verwendung der neu designten MHC Screening Tools um andere Autoimmunerkrankungen und ihre genetische Verankerung zu prüfen